(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
26. Juni 2014 (26.06.2014)

WIPO | PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2014/095804 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:
G01N 33/50 (2006.01) *G01N 33/543* (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2013/076824

(22) Internationales Anmeldedatum:
17. Dezember 2013 (17.12.2013)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102012223378.4
17. Dezember 2012 (17.12.2012) DE

(71) Anmelder: **SIEMENS AKTIENGESELLSCHAFT** [DE/DE]; Wittelsbacherplatz 2, 80333 München (DE). **CHARITÉ-UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN** [DE/DE]; Charitestrasse 1, 10117 Berlin (DE).

(72) Erfinder: **MÖCKEL, Martin**; Onkel-Tom-Straße 152, 14169 Berlin (DE). **PRZYBYLSKI, Michael**; Eichenstr. 21, 65468 Trebur (DE). **LADE, Oliver**; Hasselstraße 48, 64812 Bad Soden (DE). **RAUSCH, Saskia**; Am Volkspark 75, 10715 Berlin (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: **SIEMENS AKTIENGESELLSCHAFT**; Postfach 22 16 34, 80506 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

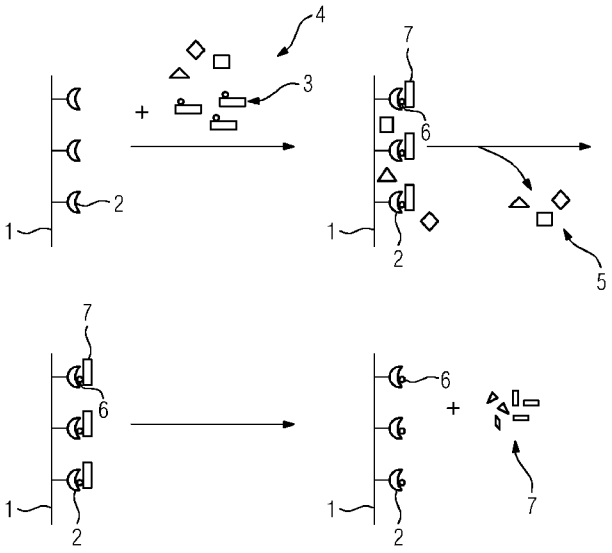
(84) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) **Title**: IN-VITRO METHOD AND KIT FOR THE DIAGNOSIS OF ACUTE CORONARY SYNDROME

(54) **Bezeichnung** : IN-VITRO VERFAHREN UND KIT ZUR DIAGNOSE VON AKUTEM KORONARSYNDROM

Figur 1



(57) **Abstract**: An in-vitro method and kit for the diagnosis of acute coronary syndrome is described. The method comprises providing a solid support (1) with at least one antibody (2), to which at least one cardiac troponin protein (3) from a specimen (4) is specifically bound, splitting the troponin protein (3) with an enzyme into at least one epitope fragment (6) bound to the antibody (2) and at least one non-epitope fragment (7), selecting the non-epitope fragment (7) specifically split by the enzyme and diagnosing acute coronary syndrome on the basis of the presence and/or absence of the enzyme-specific non-epitope fragment (7). A kit for the diagnosis of acute coronary syndrome and uses of at least one non-epitope fragment (7) of a cardiac troponin protein (3) specifically split by an enzyme are also described.

(57) **Zusammenfassung**: In-vitro Verfahren und Kit zur Diagnose von akutem Koronarsyndrom Es wird ein in-vitro Verfahren zur Diagnose von akutem Koronarsyndrom beschrieben. Das Verfahren umfasst Bereitstellen eines festen Trägers (1) mit mindestens einem Antikörper (2), an den mindestens ein kardiales Troponin-Protein (3) aus einer Probe (4) spezifisch gebunden ist, Spalten des TroponinProteins (3) mit einem Enzym in mindestens ein an den Antikörper (2) gebundenes Epitop-Fragment (6) und mindestens ein Nicht-Epitop-Fragment

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2014/095804 A1

Veröffentlicht:

— *mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)*

— *vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eingehen (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe h)*

— *mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung (Regel 5 Absatz 2 Buchstabe a)*

(7), Auslesen des durch das Enzym spezifisch gespaltenen Nicht-Epitop-Fragments (7), und das akute Koronarsyndrom wird anhand des Vorliegens und/oder Fehlens des enzymspezifischen Nicht-Epitop-Fragments (7) diagnostiziert. Ferner werden ein Kit zur Diagnose von akutem Koronarsyndrom und Verwendungen von mindestens einem durch ein Enzym spezifisch gespaltenen Nicht-Epitop-Fragment (7) mindestens eines kardialen Troponin-Proteins (3) beschrieben.

Beschreibung

In-vitro Verfahren und Kit zur Diagnose von akutem Koronarsyndrom

Die Erfindung betrifft ein in-vitro Verfahren und ein Kit zur Diagnose von akutem Koronarsyndrom sowie verschiedene Verwendungen von mindestens einem durch ein Enzym spezifisch gespaltenen Nicht-Epitop-Fragment mindestens eines kardialen Troponin-Proteins.

Als eine der häufigsten Todesursachen in der westlichen Welt sind Herz-Kreislauf-Erkrankungen von großer medizinischer Bedeutung. Lebensbedrohliche Herz-Kreislauf-Erkrankungen werden unter dem Begriff akutes Koronarsyndrom zusammengefasst. Dazu zählt beispielsweise der Myokardinfarkt (Herzinfarkt).

Bei einem Myokardinfarkt sterben Teile des Herzmuskels infolge von Ischämie ab, die länger als 20 Minuten anhält. Die Ischämie wird in der Regel durch ein Blutgerinnsel in einem Herzkranzgefäß ausgelöst. Die absterbenden Herzmuskelzellen setzen bestimmte Proteine frei, die im Blut der Patienten nachgewiesen werden können. Dazu gehören kardiale Troponin-Proteine. Die in der Blutzirkulation von ischämischen Myokardinfarktpatienten mit akutem Koronarsyndrom auftretenden Troponin-Proteine weisen spezifische posttranslationale Modifikationen auf. Beispielsweise sind die 71 N-terminalen Aminosäuren von Troponin T und die 17 C-terminalen Aminosäuren von Troponin I im Serum der Patienten abgespalten. Als spezifische Modifikation von Troponin I im Serum von Myokardinfarktpatienten ist auch eine Veränderung des Phosphorylierungsstatus der Serinreste 23/24 von Troponin I bekannt.

Für die Diagnose von akutem Koronarsyndrom werden üblicherweise Immunoassays verwendet, mit denen die Konzentration von Troponin I und Troponin T in der Blutzirkulation des Patienten bestimmt wird. Die Immunoassays sind sehr sensitiv, das heißt ein Patient mit akutem Koronarsyndrom wird mit hoher

Wahrscheinlichkeit als solcher erkannt. Problematisch ist dagegen die sichere Identifizierung von Patienten mit unspezifischen klinischen Befunden und unspezifischen EKG-Veränderungen, die trotz akuter Brustschmerzen kein akutes Koronarsyndrom aufweisen. Da diese Patienten auch erhöhte Troponin-Werte im Blut aufweisen, werden sie mittels der Immunoassays fehlerhaft als Patienten mit akutem Koronarsyndrom diagnostiziert. Solche Fehldiagnosen, die aufgrund der geringe Spezifität der Immunoassays für die Diagnose von akutem Koronarsyndrom auftreten, stellen in der klinischen Praxis ein Problem dar. Ohne eine korrekte Diagnose können viele Patienten nicht optimal behandelt werden, so dass deren Heilungschancen sinken. Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren sowie ein Kit bereit zu stellen, das eine spezifische Diagnose von akutem Koronarsyndrom ermöglicht.

Die Aufgabe wird durch ein in-vitro Verfahren mit den Merkmalen gemäß Anspruch 1 und ein Kit mit den Merkmalen gemäß Anspruch 8 gelöst.

Das erfindungsgemäße in-vitro Verfahren zur Diagnose von akutem Koronarsyndrom umfasst die Schritte: Bereitstellen eines festen Trägers mit mindestens einem Antikörper, an den mindestens ein kardiales Troponin-Protein aus einer Probe spezifisch gebunden ist, Spalten des Troponin-Proteins mit einem Enzym in mindestens ein an den Antikörper gebundenes Epitop-Fragment und mindestens ein Nicht-Epitop-Fragment, Auslesen des durch das Enzym spezifisch gespaltenen Nicht-Epitop-Fragments, und Diagnostizieren des akuten Koronarsyndroms anhand des Vorliegens und/oder Fehlens des enzymspezifischen Nicht-Epitop-Fragments.

Der Begriff „akutes Koronarsyndrom" bezeichnet eine lebensbedrohliche Herz-Kreislauf-Erkrankung, beispielsweise einen Myokardinfarkt, mit Symptomen, die länger als 20 Minuten anhalten.

Für das erfindungsgemäße Verfahren wird zunächst ein fester Träger mit mindestens einem Antikörper bereitgestellt, an den mindestens ein kardiales Troponin-Protein aus einer Probe spezifisch gebunden ist. Der Antikörper ist auf dem Träger immobilisiert und bindet spezifisch an ein oder mehrere kardiale Troponin-Proteine.

Der Begriff „kardiales Troponin-Protein" bezeichnet ein Troponin-Protein, das bei Auftreten einer Schädigung des Herzens in das Blut freigesetzt wird. Zu den kardialen Troponin-Proteinen zählen Troponin I, Troponin T und Troponin C, wobei kardiales Troponin I und kardiales Troponin T speziell im Herzmuskel exprimiert werden. Der Begriff „Troponin-Protein" umfasst alle Isoformen des Troponin-Proteins, das heißt sowohl nicht modifizierte als auch posttranslational modifizierten Formen des Troponin-Proteins. Der Begriff „posttranslationale Modifikation" bezeichnet jede Modifikation eines Proteins, die nach seiner Translation am Ribosomen statt findet. Posttranslationale Modifikationen sind beispielsweise die Phosphorylierung und/oder Oxidation von Aminosäureresten und/oder die Deletion von Aminosäuren oder Aminosäureabschnitten.

Die Bindung des Antikörpers an das kardiale Troponin-Protein beruht auf einer spezifischen nicht-kovalenten Wechselwirkung des Antikörpers mit bestimmten Aminosäureabschnitten des Troponin-Proteins, den sogenannten Epitopen. Der Begriff „Epitop" bezeichnet einen kurzen Aminosäureabschnitte eines Proteins von etwa 5 bis etwa 20 Aminosäuren, der als spezifische Bindungsstelle für einen Antikörper fungiert.

Der Begriff „Probe" bezeichnet eine Probe von beispielsweise Blut oder Serum eines Patienten, bei dem vorzugsweise ein Verdacht auf akutes Koronarsyndrom besteht.

Im erfindungsgemäßen Verfahren wird das Troponin-Protein mit einem Enzym in mindestens ein an den Antikörper gebundenes Epitop-Fragment und mindestens ein Nicht-Epitop-Fragment ge-

spalten. Durch die Bindung an den Antikörper sind etwaige Schnittstellen des Enzyms, die innerhalb der Epitope liegen, nicht zugänglich und werden vor der enzymatischen Spaltung geschützt. Das Troponin-Protein wird daher nur an den Schnittstellen des Enzyms, die für eine enzymatische Spaltung zugänglich sind, gespalten. Der Begriff „Epitop-Fragment" bezeichnet ein Fragment des Troponin-Proteins, das mindestens ein Epitop des Troponin-Proteins aufweist, an das der Antikörper gebunden ist. Das Epitop-Fragment des Troponin-Proteins bleibt daher bei der enzymatischen Spaltung des Troponin-Proteins an den Träger gebunden. Der Begriff „Nicht-Epitop-Fragment" bezeichnet ein Fragment des Troponin-Proteins, das keine Bindungsstelle für den Antikörper aufweist und dadurch bei der Spaltung des Troponin-Proteins mit einem Enzym von dem Träger gelöst wird.

Die Anzahl der Epitop-Fragmente hängt vom verwendeten Antikörper ab. Wenn der Antikörper beispielsweise nur ein Epitop des Troponin-Proteins bindet, kann bei der Spaltung durch das Enzym ein einziges Epitop-Fragment am Träger verbleiben. Der Antikörper kann aber auch zwei oder mehr Epitope des Troponin-Proteins binden, so dass durch die enzymatische Spaltung des Troponin-Proteins zwei oder mehr als zwei Epitop-Fragmente entstehen.

Die Anzahl der Nicht-Epitop-Fragmente hängt von der posttranslationalen Modifikation des Troponin-Proteins und von dem verwendeten Enzym ab. Wenn die Troponin-Isoform beispielsweise nur eine Schnittstelle für das Enzym aufweist, die außerhalb der Epitope liegt, dann entsteht bei der enzymspezifischen Spaltung ein einziges Nicht-Epitop-Fragment. Die Anzahl der Nicht-Epitop-Fragmente hängt weiter davon ab, wie viele Schnittstellen des Enzyms durch die Bindung an den Antikörper geschützt sind. In einer bevorzugten Ausführungsform spaltet das Enzym das Troponin-Protein in etwa 10 bis etwa 100 Nicht-Epitop-Fragmente, beispielsweise in etwa 50 oder in etwa 75 Nicht-Epitop-Fragmente.

Im erfindungsgemäßen Verfahren wird in einem nächsten Schritt das durch das Enzym spezifisch gespaltene Nicht-Epitop-Fragment ausgelesen. Der Begriff „Auslesen" bezeichnet jede Art der Charakterisierung des Nicht-Epitop-Fragments. Das Nicht-Epitop-Fragment kann beispielsweise durch die Bestimmung seiner Länge, seiner Masse und/oder seiner Aminosäuresequenz charakterisiert werden. Für das Auslesen können gängige Verfahren der Peptidanalyse verwendet werden. Beispielsweise können chromatographische Verfahren wie Reverse-Phase-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) zur Bestimmung der Hydrophobizität des Nicht-Epitop-Fragments und/oder Edman-Abbau zur Identifizierung der Aminosäuresequenz des Nicht-Epitop-Fragments eingesetzt werden. Das Auslesen des Nicht-Epitop-Fragments erfolgt vorteilhaft mittels Massenspektrometrie.

Das erfindungsgemäße Verfahren umfasst weiter das Diagnostizieren des akuten Koronarsyndroms anhand des Vorliegens und/oder Fehlens des enzymspezifischen Nicht-Epitop-Fragments. Aufgrund der posttranslationalen Modifikation des Troponin-Proteins in der Blutzirkulation, die spezifisch bei myokardialer Ischämie auftritt, entstehen bestimmte Nicht-Epitop-Fragmente nur bei Vorliegen der Formen des Troponin-Proteins, welche durch Nicht-Koronarsyndrome hervorgerufen werden, bzw. nur bei Vorliegen von akutem Koronarsyndrom. Die Nicht-Epitop-Fragmente weisen somit ein krankheitsspezifisches Muster auf, anhand dessen das akute Koronarsyndrom diagnostiziert werden kann. Liegt eine Schnittstelle des Enzyms zum Beispiel in einem Bereich eines Troponin-Protein, das bei akutem Koronarsyndrom von dem Protein abgespaltenen wird, so wird das Nicht-Epitop-Fragment, das durch Spalten des Enzyms an dieser Schnittstelle entsteht, nur bei den Formen des Troponin-Proteins auftreten, welche durch Nicht-Koronarsyndrome hervorgerufen werden, während es bei Vorliegen des akuten Koronarsyndroms fehlt. Die posttranslationale Abspaltung bestimmter Aminosäureabschnitte der Troponin-Proteine bei akutem Koronarsyndrom führt weiterhin dazu, dass bei der Spaltung an einer bestimmten Schnittstelle Nicht-

Epitop-Fragmente entstehen, deren Länge sich zwischen der nicht durch Koronarsyndrom hervorgerufenen und der durch Koronarsyndrom modifizierten Form des Troponin-Proteins unterscheidet. Anhand des Auslesen solcher Nicht-Epitop-Fragmente kann das akute Koronarsyndrom ebenfalls diagnostiziert werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist sehr spezifisch, so dass Patienten mit akutem Koronarsyndrom von Patienten mit anderen Ursachen für erhöhte Troponin-Werte im Blut unterschieden werden können. Dies ermöglicht eine spezifische Diagnose von akutem Koronarsyndrom und somit die sichere Identifizierung von betroffenen Patienten. Indem das Verfahren sicher stellt, dass Personen, die trotz erhöhter Troponin-Werte im Blut nicht an akutem Koronarsyndrom erkrankt sind, auch als solche erkannt werden, werden Fehldiagnosen und damit verbundene Fehlbehandlungen dieser Patienten vermieden.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist der feste Träger eine Chromatographiesäule, beispielsweise eine Sepharosesäule.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird Schritt b) bei einer Temperatur von etwa 40°C bis etwa 55°C, vorzugsweise von etwa 50°C bis etwa 53°C, und/oder für etwa 2 Minuten bis etwa 10 Minuten, vorzugsweise etwa 3 Minuten bis etwa 5 Minuten, durchgeführt. Das Spalten des Troponin-Proteins mit einem Enzym kann beispielsweise dadurch besonders schnell erfolgen, dass Mikrosäulen verwendet werden, auf denen das Enzym auf einer großen Oberfläche verteilt ist. Überraschenderweise wurde festgestellt, dass das Troponin-Protein bei einer erhöhten Temperatur besonders effizient durch ein Enzym gespalten werden kann. Eine erhöhte Temperatur bedeutet, dass die Temperatur höher als etwa 37°C ist. Das Spalten des Troponin-Proteins kann beispielsweise bei etwa 40°C oder bei etwa 53°C erfolgen. Die Temperatur wird vorzugsweise in Abhängigkeit der Thermostabilität und der Aktivität des verwendeten Enzyms gewählt. Durch die erhöhte Temperatur wird die enzymatische Spaltung des Troponin-Proteins und somit auch das Verfahren

insgesamt beschleunigt. Das Spalten des Troponin-Proteins erfolgt vorzugsweise in etwa 3 Minuten, etwa 5 Minuten oder etwa 8 Minuten. Durch die Spaltung des Troponin-Proteins in nur etwa 2 Minuten bis etwa 10 Minuten ist das erfindungsgemäße Verfahren insbesondere für den Einsatz im klinischen Umfeld geeignet, da es eine schnelle und spezifische Diagnose von akutem Koronarsyndrom ermöglicht. Somit können lebenswichtige therapeutische Maßnahmen frühzeitig eingeleitet werden, wodurch sich die Heilungschancen der Patienten verbessern.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird nach Schritt b) das Epitop-Fragment quantifiziert. Das Epitop-Fragment kann für die Quantifizierung beispielsweise durch Behandeln des Trägers mit Trifluoressigsäure von dem Antikörper gelöst werden. Durch die Quantifizierung des Epitop-Fragments wird die Konzentration aller Formen des Troponin-Proteins in der Probe bestimmt. Diese Troponin-Konzentration ist ein wertvoller klinischer Parameter, der neben diagnostischen Zwecken auch für die Abschätzung des Risikos, mit der die Erkrankung fortschreitet oder zu weiteren Komplikationen führt, von Bedeutung ist. Beispielsweise steht die Troponin-Konzentration mit der Größe eines Myokardinfarkts und mit der Überlebensrate nach einem Infarkt in Zusammenhang. Somit kann die Quantifizierung des Epitop-Fragments für die Feindiagnose von akutem Koronarsyndrom beitragen. Die Quantifizierung des Epitop-Fragments kann mittels üblicher Verfahren der Peptidquantifizierung durchgeführt werden, beispielsweise mit Massenspektrometrie.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Troponin-Protein Troponin I und/oder Troponin T. Troponin I und Troponin T sind spezifische Marker im Blut bzw. im Serum von Patienten mit einer Myokardschädigung. Für beide Troponin-Proteine sind spezifische posttranslationale Modifikationen beschrieben, die bei Myokardinfarkt auftreten. Daher sind Troponin I und/oder Troponin T zur Verwendung in dem erfindungsgemäßen Verfahren besonders geeignet.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt das Auslesen des durch das Enzym spezifisch gespaltenen Nicht-Epitop-Fragments mittels Massenspektrometrie. Die Massenspektrometrie ist ein hochempfindliches Verfahren zur Charakterisierung von Proteinen und Peptiden, mit dem die Masse jedes Nicht-Epitop-Fragments ermittelt werden kann. Sind die Schnittstellen des verwendeten Enzyms im Troponin-Protein bekannt, so kann die Masse dem enzymspezifischen Nicht-Epitop-Fragment zugeordnet werden. Außerdem erlaubt die Masse des Nicht-Epitop-Fragments einen Rückschluss auf dessen Aminosäuresequenz. Dadurch kann das Vorliegen und/oder Fehlen enzymspezifischer Nicht-Epitop-Fragmente mit hoher Genauigkeit bestimmt werden. Das Auslesen der Nicht-Epitop-Fragmente kann beispielsweise mit MALDI-MS (Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation Massenspektrometrie) und/oder ESI-MS (Elektronenspray-Ionisation Massenspektrometrie) durchgeführt werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Schritte a) bis c) des erfindungsgemäßen Verfahrens mittels Affinitäts-Massenspektrometrie durchgeführt. Dabei wird eine Affinitätschromatographie zum Bereitstellen des Träger mit dem an den Antikörper gebundenen Troponin-Protein mit einer Massenspektrometrie zum Auslesen des durch das Enzym spezifisch gespaltenen Nicht-Epitop-Fragments kombiniert. Die Affinitäts-Massenspektrometrie ist einfach zu standardisieren und ermöglicht eine effiziente Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird nach Schritt b) das durch das Enzym spezifisch gespaltene Nicht-Epitop-Fragment quantifiziert. Die Quantifizierung des Nicht-Epitop-Fragments ergibt die Konzentration der jeweiligen posttranslational modifizierten Form des Troponin-Proteins in der Probe. Die Quantifizierung kann beispielsweise mittels Massenspektrometrie durchgeführt werden. Aus der Konzentration der einzelnen modifizierten Troponin-Formen können Informationen über den Krankheitsverlauf und/oder die Schwere des akuten Koronarsyndroms abgeleitet werden. Somit liefert die

Quantifizierung des Nicht-Epitop-Fragments einen wertvollen klinischen Parameter für die Feindiagnose von akutem Koronarsyndrom.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt das Quantifizieren des Nicht-Epitop-Fragments unter Verwendung des gleichen Verfahrens, mit der das Nicht-Epitop-Fragment auslesen wird. Dadurch kann das Nicht-Epitop-Fragment auf effiziente und kostengünstige Weise identifiziert und quantifiziert werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Antikörper ein monoklonaler Antikörper. Während polyklonale Antikörper aufgrund ihrer Herstellung ein Gemisch von Antikörpern darstellen, die an unterschiedliche Epitope des Troponin-Proteins binden, erkennt ein monoklonaler Antikörper im Optimalfall ein spezifisches Epitop des Troponin-Proteins. Der monoklonale Antikörper wird vorteilhaft so ausgewählt, dass er nicht an Aminosäureabschnitte des Troponin-Proteins bindet, in denen posttranslationale Modifikationen auftreten können. Dadurch wird sicher gestellt, dass alle Isoformen des Troponin-Proteins an den Antikörper binden, insbesondere auch posttranslational modifizierte Formen, denen bestimmte Aminosäureabschnitte fehlen.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden ein erster und ein zweiter Antikörper mit unterschiedlichen Spezifitäten verwendet. In diesem Fall sind zwei verschiedene kardiale Troponin-Proteine aus der Probe an den Träger gebunden, die zusammen in einem Verfahrensdurchlauf zur Diagnose von akutem Koronarsyndrom herangezogen werden. Dadurch wird die Spezifität der Diagnose erhöht.

In einer bevorzugten Ausführungsform bindet der erste Antikörper spezifisch Troponin I und der zweite Antikörper bindet spezifisch Troponin T. Dadurch sind sowohl Troponin I- als auch Troponin T-Proteine an den Träger gebunden. Beide Troponin-Proteine weisen bei Vorliegen des akuten Koronarsyn-

droms ischämisch bedingte posttranslationale Modifikationen auf. Das Auslesen der Nicht-Epitop-Fragmente von sowohl Troponin T als auch Troponin I ermöglicht es daher, das akute Koronarsyndrom mit einer hohen Spezifität zu diagnostizieren.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden Muster, die beim Auslesen mehrerer Nicht-Epitop-Fragmente von mindestens zwei unterschiedlichen Troponin-Proteinen wie beispielsweise Troponin I und Troponin T erhalten werden, einer zugrundeliegenden Erkrankung zugeordnet. Die krankheitsspezifischen Muster, die als Troponin-Fingerprints bezeichnet werden, entstehen aufgrund der unterschiedlichen posttranslationalen Modifikationen der Troponin-Proteine, die bei verschiedenen Herz-Kreislauf-Erkrankungen auftreten. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird der Troponin-Fingerprint für die Zuordnung der zugrundeliegenden Erkrankung mit der Konzentration der einzelnen modifizierten Troponin-Formen kombiniert, die durch die Quantifizierung der Nicht-Epitop-Fragmente gewonnen wird. Durch die Troponin-Muster bzw. -Fingerprints wird die Diagnose von akutem Koronarsyndrom um die Identifizierung der konkreten zugrundeliegenden Erkrankung erweitert. Dadurch wird die Spezifität der Diagnose erhöht und die Feststellung einer geeigneten Behandlungsstrategie vereinfacht.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Enzym eine Protease. Die Protease wird so ausgewählt, dass sie das Troponin-Protein an mindestens einer Schnittstelle spaltet. Vorteilhaft wird eine Protease eingesetzt, deren Schnittstelle oder Schnittstellen in dem Troponin-Protein bekannt sind, wie beispielsweise Trypsin oder Chymotrypsin. Dadurch wird das nachfolgende Auslesen des durch das Enzym spezifisch gespaltenen Nicht-Epitop-Fragments erleichtert. Trypsin beispielsweise spaltet Proteine nach den Aminosäuren Lysin und Arginin.

Bei der enzymatischen Troponin-Spaltung ist es möglich, dass das Enzym jedes an den Träger gebundene Troponin-Protein an jeder zugänglichen, das heißt nicht durch die Antikörperbin-

dung geschützten, Schnittstelle spaltet. Die meisten Enzyme spalten jedoch nicht jedes Troponin-Protein an jeder möglichen Schnittstelle. Vielmehr kommt es vor, dass das Enzym in einem Teil der Proteine einzelne oder mehrere zugängliche Schnittstellen auslässt. Das Ausmaß dieses Auslassens von Schnittstellen hängt vor allem von der Enzymaktivität ab und kann durch die Bedingungen der Troponin-Spaltung wie beispielsweise Dauer, pH-Wert und/oder Temperatur beeinflusst werden. Wenn das Enzym in einem Teil der Troponin-Proteine einzelne oder mehrere Schnittstellen auslässt, entstehen zusätzlich zu den Fragmenten, die durch Spaltung der Troponin-Proteine an zwei benachbarten Schnittstellen gebildet werden, auch längere Epitop- und Nicht-Epitop-Fragmente. Je mehr Schnittstellen das Enzym auslässt, umso größer ist die Anzahl der möglichen Nicht-Epitop-Fragmente. Mit der steigenden Anzahl an Nicht-Epitop-Fragmenten erhöht sich die Komplexität des Ausleseschrittes. Außerdem kann der Nachweis bestimmter Nicht-Epitop-Fragmente durch eine hohe Anzahl an Nicht-Epitop-Fragmenten erschwert werden. Die Bedingungen der Troponin-Spaltung werden daher vorzugsweise so gewählt, dass das Enzym höchstens zwei aufeinanderfolgende Schnittstellen auslässt. Dadurch können die Nicht-Epitop-Fragmente effizient ausgelesen und das Vorliegen und/oder Fehlen von Nicht-Epitop-Fragmenten kann auf einfache Weise detektiert werden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist das Enzym Chymotrypsin. Chymotrypsin spaltet Proteine nach den Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan, Phenylalanin, Leucin und Methionin. Bei der Spaltung von Troponin I oder Troponin T mit Chymotrypsin entstehen mehrere Nicht-Epitop-Fragmente, die nur bei der nicht durch Koronarsyndrom hervorgerufenen, nicht oder anders modifizierten Form des Troponin-Proteins vorliegen, und somit bei akutem Koronarsyndrom fehlen. Zusätzlich werden Nicht-Epitop-Fragmente erzeugt, die nur bei ischämisch posttranslational modifizierten Troponin-Isoformen auftreten. Dadurch, dass bestimmte chymotrypsinspezifische Nicht-Epitop-Fragmente nur bei der nicht durch Koronarsyndrom hervorgerufenen Form oder nur bei der durch Koronarsyndrom modifizier-

ten Form des Troponin-Proteins entstehen und somit bei der jeweiligen anderen Form fehlen, wird die Diagnose von akutem Koronarsyndrom erleichtert, was zu der hohen Spezifität des erfindungsgemäßen Verfahrens beiträgt.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft ein Kit zur Diagnose von akutem Koronarsyndrom umfassend einen festen Träger mit mindestens einem ersten Antikörper und mindestens einem zweiten Antikörper, wobei die Antikörper jeweils unterschiedliche kardiale Troponin-Proteine spezifisch binden. Somit werden zwei verschiedene kardiale Troponin-Proteine an den Träger gebunden, die zusammen zur Diagnose von akutem Koronarsyndrom herangezogen werden. Dadurch wird eine hohe Spezifität der Diagnose erreicht.

In einer bevorzugten Ausführungsform bindet der erste Antikörper spezifisch Troponin I, und der zweite Antikörper bindet spezifisch Troponin T.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung von mindestens einem durch ein Enzym spezifisch gespaltenen Nicht-Epitop-Fragment mindestens eines kardialen Troponin-Proteins zur Diagnose von akutem Koronarsyndrom. Das Nicht-Epitop-Fragment wird vorteilhaft so ausgewählt, dass es ein Nicht-Epitop-Fragment ist, das nur bei enzymatischer Spaltung einer ischämisch posttranslational modifizierten Form des Troponin-Proteins entsteht. Anhand des Vorliegens dieses Nicht-Epitop-Fragments wird das akute Koronarsyndrom diagnostiziert.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft eine Verwendung von mindestens einem durch ein Enzym spezifisch gespaltenen Nicht-Epitop-Fragment mindestens eines kardialen Troponin-Proteins zum Nachweis von mindestens einer posttranslationalen Modifikation des Troponin-Proteins. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die posttranslationale Modifikation des Troponin-Proteins eine Abspaltung von N-terminalen oder C-terminalen Aminosäureabschnitten, wie sie

bei Troponin-Proteinen im Blut von Myokardinfarktpatienten auftreten. Das Nicht-Epitop-Fragment kann nicht nur zum Nachweis einer bekannten posttranslationalen Modifikation des Troponin-Proteins verwendet werden, sondern auch zur Identifizierung und Charakterisierung von neuen posttranslationalen Modifikationen des Troponin-Proteins eingesetzt werden.

Im Folgenden wird eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens anhand einer schematischen Zeichnung dargestellt.

Figur 1 zeigt einen festen Träger 1, der von einer Sepharosesäule gebildet wird und auf dessen Oberfläche monoklonale Antikörper 2 immobilisiert sind. Zunächst wird eine Probe 4 mit der Sepharosesäule in Kontakt gebracht. Die Probe 4 ist Serum eines Patienten mit Verdacht auf akutes Koronarsyndrom und enthält neben den gewöhnlichen Serumproteinen kardiale Troponin-Proteine 3. Die Antikörper 2 auf der Säule binden spezifisch kardiales Troponin I. Somit binden die im Serum enthaltenen kardialen Troponin I-Proteine bei Kontakt mit der Säule an die Antikörper 2. Die Säule wird anschließend mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen, um ungebundene Proteine 5 von der Säule zu entfernen. In einem nächsten Schritt wird die Säule mit Chymotrypsin in Kontakt gebracht. Die Chymotrypsinspaltung wird für 5 Minuten bei 53°C durchgeführt, wobei Chymotrypsin das an die Säule gebundene Troponin I spezifisch in mehrere Fragmente spaltet. Dabei sind diejenigen Schnittstellen von Chymotrypsin, die im Bereich der Bindungsstellen des Antikörpers 2 an Troponin I liegen, durch den Antikörper 2 vor einer Spaltung durch Chymotrypsin geschützt. Troponin-Fragmente, die die Epitope umfassen, bleiben als Epitop-Fragmente 6 an die Antikörper 2 gebunden, während sich durch Chymotrypsin spezifisch gespaltene Nicht-Epitop-Fragmente 7 von der Säule lösen. Die Nicht-Epitop-Fragmente 7 können durch Waschen der Säule von dieser getrennt werden. Anschließend werden die Nicht-Epitop-Fragmente 7 mittels Massenspektrometrie analysiert, um spezifische posttranslationale Modifikationen von Troponin I nach-

zuweisen (nicht dargestellt). Durch Behandeln der Säule mit Trifluoressigsäure werden die Epitop-Fragmente 6 von den Antikörpern 2 gelöst und zur Bestimmung der Troponin I-Konzentration im Serum verwendet(nicht dargestellt).

Beispiele

Im Folgenden sind Beispiele für mittels Massenspektrometrie ausgelesene Nicht-Epitop-Fragmente der humanen kardialen Troponin-Proteine Troponin I und Troponin T gezeigt. Die Bedingungen wurden in allen Beispielen so gewählt, dass Cystein-und Methioninreste in reduzierter Form vorliegen und bei der Troponin-Spaltung höchstens zwei Schnittstellen von dem Enzym ausgelassen werden. Die Massen der Nicht-Epitop-Fragmente sind in $[M+H]^+$ angegeben. In der ersten Spalte der Tabellen sind die Massen der Nicht-Epitop-Fragmente aufgeführt, die bei Vorliegen der nicht modifizierten Form des jeweiligen Troponin-Proteins entstehen. In der zweiten Spalte der Tabellen sind die Massen der Nicht-Epitop-Fragmente aufgeführt, die bei Vorliegen einer posttranslational modifizierten Form des jeweiligen Troponin-Proteins und damit bei Vorliegen des akuten Koronarsyndroms detektiert werden. In der dritten Spalte der Tabellen sind die Aminosäuresequenzen der Nicht-Epitop-Fragmente angegeben, die entweder nur bei der nicht modifizierten Form oder nur bei der modifizierten Form des Troponin-Proteins entstehen. Die Angaben der Schnittstellen beziehen sich auf die Position der Aminosäuren in der nicht modifizierten Form des jeweiligen Troponin-Proteins, beginnend vom N-terminalen Ende des Proteins.

Beispiel 1: Troponin I

Bei Ischämie tritt eine C-terminal modifizierte Form von Troponin I auf, die am C-terminalen Ende um 17 Aminosäuren verkürzt ist. Als Antikörper wurde der anti-Troponin I Antikörper aus dem Siemens Immulite 2500 cTnI Kit (2nd generation assay, Siemens Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA) verwendet. Die Bindungsstelle des Antikörpers liegt

im Abschnitt von Aminosäure 24 bis 40 des Troponin I-Proteins. Dieses Epitop des Troponin I-Proteins ist durch die Bindung an den Antikörper vor der Spaltung durch Chymotrypsin und/oder Trypsin geschützt. Aus Vorarbeiten ist bekannt, dass das N-terminale Methionin des Troponin I in der massenspektrometrischen Analyse nicht detektiert wird.

Aminosäuresequenz der nicht modifizierten Form von Troponin I:

M ADGSSDAARE PRPAPAPIRR RSSNYRAYAT EPHAKKKSKI SASRKLQLKT LLLQIAKQEL EREAEERRGE KGRALSTRCQ PLELAGLGFA ELQDLCRQLH ARVDKVDEER YDIEAKVTKN ITEIADLTQK IFDLRGKFKR PTLRRVRISA DAMMQALLGA RAKESLDLRA HLKQVKKEDT EKENREVGDW RKNIDALSGMEGRKKKFES (SEQ ID NO: 1)

Die Aminosäuresequenz der C-terminal posttranslational modifizierten Form von Troponin I ist unter SEQ ID NO: 2 gezeigt.

1. Spalten von Troponin I mit Chymotrypsin

Nicht modifizierte Form von Troponin I	Modifizierte Form von Troponin I	Aminosäuresequenz
3.888,0501	3.888,0501	
3.770,9493	3.770,9493	
3.505,8622		RAHLKQVKKEDTEKENREVG DWRKNIDAL (SEQ ID NO: 3)
3.381,7767	3.381,7767	

Nicht modifizierte Form von Tryptonin I	Modifizierte Form von Tryptonin I	Aminosäuresequenz
3.303,6749		KQVKKEDTEKENREVGDWRK NIDALSGM (SEQ ID NO: 4)
3.270,6964	3.270,6964	
3.028,5810		KQVKKEDTEKENREVGDWRK NIDAL (SEQ ID NO: 5)
	2.979,5871	RAHLKQVKKEDTEKENREVG DWRK (SEQ ID NO: 6)
2.923,5020	2.923,5020	
2.813,4434	2.813,4434	
2.709,4754	2.709,4754	
2.695,3910	2.695,3910	
2.618,4287	2.618,4287	
2.596,3913	2.596,3913	
2.571,3168	2.571,3168	
	2.502,3059	KQVKKEDTEKENREVGDWRK (SEQ ID NO: 7)
2.390,3177	2.390,3177	
2.373,1728	2.373,1728	
2.258,3138	2.258,3138	
2.218,1098	2.218,1098	
2.017,0032	2.017,0032	
1.978,1014		RKNIDALSGMEGRKKKF (SEQ ID NO: 8)
1.901,0684	1.901,0684	
1.785,9314	1.785,9314	

Nicht modifizierte Form von Tryptophan in I	Modifizierte Form von Tryptophan in I	Aminosäuresequenz
1.772,9640	1.772,9640	
1.770,0279	1.770,0279	
1.617,8675	1.617,8675	
1.536,8604	1.536,8604	
1.516,7502	1.516,7502	
1.383,7049		SGMEGRKKKFES (SEQ ID NO: 9)
1.352,7685	1.352,7685	
1.330,7953	1.330,7953	
1.305,6878	1.305,6878	
1.287,6725	1.287,6725	
1.256,7321	1.256,7321	
1.188,6041	1.188,6041	
1.174,6473	1.174,6473	
1.172,6633	1.172,6633	
1.167,6303		SGMEGRKKKF (SEQ ID NO: 10)
1.108,6109		EGRKKKFES (SEQ ID NO: 11)
1.104,5830		RKNIDALSGM (SEQ ID NO: 12)
1.102,6843	1.102,6843	
1.059,5793	1.059,5793	
1.055,6459	1.055,6459	
1.046,5299	1.046,5299	
944,5523	944,5523	
942,5618	942,5618	
892,5363	892,5363	

Nicht modifizierte Form von Tryptonin I	Modifizierte Form von Tryptonin I	Aminosäuresequenz
892,4410	892,4410	
875,4403	875,4403	
864,4825	864,4825	
831,4683	831,4683	
829,4890		RKNIDAL (SEQ ID NO: 13)
829,4778	829,4778	
804,4032	804,4032	
777,4141	777,4141	
735,4148	735,4148	
724,4100	724,4100	
715,4712	715,4712	
706,3770	706,3770	
688,3512	688,3512	
636,3715	636,3715	
614,3984	614,3984	
602,3872	602,3872	
587,4126	587,4126	
575,3221	575,3221	
536,2715	536,2715	
519,2708	519,2708	
507,3038	507,3038	
502,2871	502,2871	
496,2990	496,2990	
474,3286	474,3286	

Nicht modifizierte Form von Troponin I	Modifizierte Form von Troponin I	Aminosäuresequenz
464,2503	464,2503	
462,2381	462,2381	
444,2816	444,2816	
375,1874	375,1874	
361,2445	361,2445	
332,1816	332,1816	
331,1976	331,1976	
	303,2139	RK
294,1118		SGM
261,1445	261,1445	
260,1605	260,1605	
260,1605	260,1605	
247,1288	247,1288	
245,1859	245,1859	
235,0924		ES
223,1077	223,1077	
150,0583	150,0583	
132,1019	132,1019	

Durch die chymotrypsinspezifische Spaltung nach Aminosäure 190 entsteht bei der modifizierten Form von Troponin I ein Nicht-Epitop-Fragment aus zwei Aminosäuren RK mit der Masse 303,2139 $[M+H]^+$. Bei der nicht modifizierten Form entsteht bei gleichzeitiger Spaltung nach Aminosäure 197, die in der

modifizierten Form nicht existiert, ein Nicht-Epitop-Fragment aus sieben Aminosäuren mit der Sequenz RKNIDAL (SEQ ID NO: 13) und einer Masse von 829,4890 $[M+H]^+$. Wenn keine Spaltung durch Chymotrypsin nach Aminosäure 190 erfolgt, aber an der kurz davor liegenden Schnittstelle nach Aminosäure 172, entsteht bei der modifizierten Form von Troponin I ein Nicht-Epitop-Fragment der Sequenz KQVKKEDTEKENREVGDWRK (SEQ ID NO: 7) mit der Masse 2.502,3059 $[M+H]^+$. Bei der nicht modifizierten Form entsteht bei gleichzeitiger Spaltung nach Aminosäure 197 dagegen ein Nicht-Epitop-Fragment der Sequenz KQVKKEDTEKENREVGDWRKNIDAL (SEQ ID NO: 5) mit der Masse 3.028,5810 $[M+H]^+$. Wenn keine Spaltung nach den Aminosäuren 190 und 172, 171 erfolgt, entsteht durch Spaltung nach Aminosäure 168 bei der modifizierten Form von Troponin I ein Nicht-Epitop-Fragment der Sequenz RAHLKQVKKEDTEKENREVG DWRK (SEQ ID NO: 6) (2.979,5871 $[M+H]^+$) und bei der nicht modifizierten Form ein Nicht-Epitop-Fragment der Sequenz RAHLKQVKKEDTEKENREVG DWRKNIDAL (SEQ ID NO: 3) (3.505,8622 $[M+H]^+$).

2. Spalten von Troponin I mit Trypsin

Nicht modifizierte Form von Troponin I	Modifizierte Form von Troponin I	Aminosäuresequenz
3.209,6670	3.209,6670	
3.023,5553	3.023,5553	
2.817,4498	2.817,4498	
2.681,3650	2.681,3650	

Nicht modifizierte Form von Tryptonin I	Modifizierte Form von Tryptonin I	Aminosäuresequenz
2.604,3272	2.604,3272	
2.360,2424	2.360,2424	
2.293,2285	2.293,2285	
2.218,2441	2.218,2441	
2.169,1873	2.169,1873	
2.090,0849	2.090,0849	
2.076,0252	2.076,0252	
2.075,1495	2.075,1495	
2.037,2430	2.037,2430	
2.032,9868		EVGDWRKNIDALSGMEGR (SEQ ID NO: 14)
1.933,9838	1.933,9838	
1.902,0411	1.902,0411	
1.890,0331	1.890,0331	
1.859,0102	1.859,0102	
1.762,7990	1.762,7990	
1.708,8388	1.708,8388	
1.702,9091	1.702,9091	
1.694,8595	1.694,8595	
1.646,8716	1.646,8716	
1.594,8295	1.594,8295	
1.573,8795	1.573,8795	
1.554,9213	1.554,9213	
1.536,8856	1.536,8856	

Nicht modifizierte Form von Tryptonin I	Modifizierte Form von Tryptonin I	Aminosäuresequenz
1.510,0090	1.510,0090	
1.447,7395	1.447,7395	
1.444,7139	1.444,7139	
1.418,7420		KNIDALSGMEGRK (SEQ ID NO: 15); alternativ NIDALSGMEGRKK (SEQ ID NO: 16)
1.415,8342	1.415,8342	
1.381,9141	1.381,9141	
1.380,7957	1.380,7957	
1.366,6485	1.366,6485	
1.290,6470		KNIDALSGMEGR (SEQ ID NO: 17); alternativ NIDALSGMEGRK (SEQ ID NO: 18)
1.288,6392	1.288,6392	
1.288,6127	1.288,6127	
1.259,7331	1.259,7331	
1.245,6685	1.245,6685	
1.181,6637	1.181,6637	
1.162,5521		NIDALSGMEGR (SEQ ID NO: 19)
1.160,5443	1.160,5443	
1.148,5542	1.148,5542	
1.123,6622	1.123,6622	
1.104,5895	1.104,5895	
1.103,6320	1.103,6320	

Nicht modifizierte Form von Tropon in I	Modifizierte Form von Tropon in I	Aminosäuresequenz
1.103,5439	1.103,5439	
1.102,6843	1.102,6843	
1.074,6014	1.074,6014	
1.073,6690	1.073,6690	
1.066,5779	1.066,5779	
1.053,6752	1.053,6752	
1.020,4592	1.020,4592	
989,4898	989,4898	
966,5479	966,5479	
951,6098	951,6098	
931,5207	931,5207	
917,5679	917,5679	
899,5924	899,5924	
889,4526	889,4526	
849,3697	849,3697	
848,4988	848,4988	
823,5148	823,5148	
798,5057	798,5057	
789,3849	789,3849	
761,3576	761,3576	
760,4424	760,4424	
749,3675	749,3675	
738,3668	738,3668	
732,3886	732,3886	

Nicht modifizierte Form von Tryptonin I	Modifizierte Form von Tryptonin I	Aminosäuresequenz
702,4005	702,4005	
674,3468	674,3468	
663,3824	663,3824	
647,2995	647,2995	
642,4045	642,4045	
638,3508		KKFES (SEQ ID NO: 20)
633,2838	633,2838	
629,4344	629,4344	
624,3576	624,3576	
621,2726	621,2726	
547,3198	547,3198	
546,2994	546,2994	
510,2558		KFES (SEQ ID NO: 21)
502,3347	502,3347	
501,3395	501,3395	
489,2779	489,2779	
479,2976	479,2976	
468,2929	468,2929	
430,2885	430,2885	
418,2045	418,2045	
403,3027		KKK
382,1609		FES
374,2398	374,2398	
361,2081	361,2081	

Nicht modifizierte Form von Troponin I	Modifizierte Form von Troponin I	Aminosäuresequenz
347,2289	347,2289	
333,1768	333,1768	
331,2200	331,2200	
294,1812	294,1812	
275,2077	275,2077	
274,1873	274,1873	
232,1404	232,1404	
218,1499	218,1499	
204,1342	204,1342	
175,1189	175,1189	
147,1128	147,1128	

Durch die trypsinspezifischen Schnittstellen nach den Aminosäuren 192 und 193, die am C-terminalen Ende der verkürzten modifizierten Form von Troponin I liegen, entstehen Nicht-Epitop-Fragmente, die nur bei der nicht modifizierten Form des Proteins vorliegen. Diese Fragmente treten also nur bei Patienten auf, die kein akutes Koronarsyndrom haben. Ein Beispiel ist das Nicht-Epitop-Fragment der Sequenz EVGDWRKNIDALSGMEGR (SEQ ID NO: 14) (2.032,9868 $[M+H]^+$). Durch die Spaltung durch Trypsin an Schnittstellen, die in dem Abschnitt von Troponin I liegen, der bei der modifizierten Form fehlt, treten weitere Nicht-Epitop-Fragmente auf, die nur bei der nicht modifizierten Form des Proteins entstehen. Beispie-

le für solche Fragmente sind KKFES (SEQ ID NO: 20) (638,3508 $[M+H]^+$) und KFES (SEQ ID NO: 21) (510,2558 $[M+H]^+$).

Beispiel 2: Troponin T

Für Troponin T ist eine N-terminale posttranslationale Modifikation beschrieben, die bei myokardialer Ischämie auftritt. Die modifizierte Form entsteht durch die Abspaltung der N-terminalen Aminosäuren 1 bis 71 von Troponin T. Als Antikörper wurden der M7 Antikörper und der M11.7 Antikörper (beide Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland) verwendet. Die Bindungsstellen der Antikörper liegen beim M7 Antikörper im Abschnitt von Aminosäure 125 bis 131 und beim M11.7 Antikörper im Abschnitt von Aminosäure 136 bis 147 des Troponin T-Proteins. Diese Epitope des Troponin T-Proteins sind durch ihre Bindung an die Antikörper vor der Spaltung durch Trypsin geschützt.

Aminosäuresequenz der nicht modifizierten Form von Troponin T:
MSDIEEVVEEYEEEEQEEAAVEEQEEAAEEDAEAEAETEETRAEEDEEEEEAKEAEDGPM
EESKPKPRSFMPNLVPPKIPDGERVDFDDIHRKRMEKDLNELQALIEAHFENRKKEEEEL
VSLKDRIERRRAERAEQQRIRNEREKERQNRLAEERARREEEENRRKAEDEARKKKALSN
MMHFGGYIQKQAQTERKSGKRQTEREKKKKILAERRKVLAIDHLNEDQLREKAKELWQSI
YNLEAEKFDLQEKFKQQKYEINVLRNRINDNQKVSKTRGKAKVTGRWK (SEQ ID NO: 22)

Die Aminosäuresequenz der N-terminal posttranslational modifizierten Form von Troponin T ist unter SEQ ID NO: 23 gezeigt.

1. Spalten von Troponin T mit Chymotrypsin

Nicht modifizierte Form von Tropon in T	Modifizierte Form von Tropon in T	Aminosäuresequenz
7.934,2965		SDIEEVVEEYEEEEQEEAAV EEQEEAAEEDAEAEAETEET RAEEDEEEEEAKEAEDGPME ESKPKPRSF (SEQ ID NO: 24)
7.197,0032		EEEEQEEAAVEEQEEAAEED AEAEAETEETRAEEDEEEEE AKEAEDGPMEESKPKPRSFM PNL (SEQ ID NO: 25)
6.879,7228		MSDIEEVVEEYEEEEQEEAA VEEQEEAAEEDAEAEAETEE TRAEEDEEEEEAKEAEDGPM (SEQ ID NO: 26)
6.748,6823		SDIEEVVEEYEEEEQEEAAV EEQEEAAEEDAEAEAETEET RAEEDEEEEEAKEAEDGPM (SEQ ID NO: 27)
6.741,7830		EEEEQEEAAVEEQEEAAEED AEAEAETEETRAEEDEEEEE AKEAEDGPMEESKPKPRSF (SEQ ID NO: 28)
5.556,1688		EEEEQEEAAVEEQEEAAEED AEAEAETEETRAEEDEEEEE AKEAEDGPM (SEQ ID NO: 29)
4.441,6065	4.441,6065	
4.169,4217	4.169,4217	
3.956,2165	3.956,2165	
3.892,3155	3.892,3155	
3.660,8405	3.660,8405	

Nicht modifizierte Form von Tripton T	Modifizierte Form von Tripton T	Aminosäuresequenz
3.601,0197	3.601,0197	
3.529,8000	3.529,8000	
3.408,9410	3.408,9410	
3.316,8924	3.316,8924	
3.280,8461	3.280,8461	
3.197,6845	3.197,6845	
3.109,6138	3.109,6138	
3.039,7861	3.039,7861	
3.005,5625	3.005,5625	
2.975,5342		MPNLVPPKIPDGERVDFDDI HRKRM (SEQ ID NO: 30)
	2.844,4937	PNLVPPKIPDGERVDFDDIH RKRM (SEQ ID NO: 31)
2.840,6190	2.840,6190	
2.712,5240	2.712,5240	
2.520,3139	2.520,3139	
2.213,1196	2.213,1196	
2.200,1244	2.200,1244	
2.022,0614	2.022,0614	
2.020,0934	2.020,0934	
1.923,9996		MPNLVPPKIPDGERVDF (SEQ ID NO: 32)
1.911,9705	1.911,9705	
1.900,9399	1.900,9399	
1.794,9748	1.794,9748	

Nicht modifizierte Form von Tryptonin	Modifizierte Form von Tryptonin	Aminosäuresequenz
	1.792,9591	PNLVPPKIPDGERVDF (SEQ ID NO: 33)
1.659,8523		EESKPKPRSFMPNL (SEQ ID NO: 34)
1.658,8496	1.658,8496	
1.602,8333	1.602,8333	
1.555,8009	1.555,8009	
1.550,8325	1.550,8325	
1.472,7703	1.472,7703	
1.468,7794	1.468,7794	
1.454,7638	1.454,7638	
1.420,8383	1.420,8383	
1.383,6790	1.383,6790	
1.342,5719		MSDIEEVVEEY (SEQ ID NO: 35)
1.341,6685	1.341,6685	
1.303,6488	1.303,6488	
1.284,6582	1.284,6582	
1.262,7103	1.262,7103	
1.226,6528	1.226,6528	
1.211,5314		SDIEEVVEEY (SEQ ID NO: 36)
1.204,6320		EESKPKPRSF (SEQ ID NO: 37)
1.172,6157	1.172,6157	
1.167,5640	1.167,5640	
1.078,5415	1.078,5415	
1.070,5523	1.070,5523	

Nicht modifizierte Form von Tryptin	Modifizierte Form von Tryptin	Aminosäuresequenz
1.059,5945	1.059,5945	
928,4887	928,4887	
923,4621	923,4621	
873,5152	873,5152	
871,5472	871,5472	
860,4360	860,4360	
851,4145	851,4145	
850,4305	850,4305	
779,3934	779,3934	
766,3011	766,3011	
737,3828	737,3828	
711,2919	711,2919	
696,3351	696,3351	
694,3882	694,3882	
687,3672	687,3672	
623,3035	623,3035	
618,2729	618,2729	
616,3089	616,3089	
587,3399	587,3399	
580,2514	580,2514	
568,3089	568,3089	
551,2824	551,2824	
510,2558	510,2558	
504,2664	504,2664	

Nicht modifizierte Form von Troponin T	Modifizierte Form von Troponin T	Aminosäuresequenz
482,1738	482,1738	
474,2381		MPNL (SEQ ID NO: 38)
434,1856	434,1856	
375,1874	375,1874	
351,1333	351,1333	
	343,1976	PNL
331,1976	331,1976	
318,2023	318,2023	
303,1451	303,1451	
296,1241	296,1241	
247,1288	247,1288	
246,1448	246,1448	
205,0971	205,0971	
150,0583	150,0583	
147,1128	147,1128	

Durch die chymotrypsinspezifische Spaltung nach Aminosäure 74 entsteht bei der modifizierten Form von Troponin T ein kurzes Nicht-Epitop-Fragment aus drei Aminosäuren der Sequenz PNL mit der Masse 343,1976 $[M+H]^+$. Bei der nicht modifizierten Form des Troponin T-Proteins entsteht dagegen bei gleichzeitiger Spaltung nach Aminosäure 70 ein längeres Nicht-Epitop-Fragment mit der Sequenz MPNL (SEQ ID NO: 38) und der Masse 474,2381 $[M+H]^+$. Erfolgt keine Spaltung durch Chymotrypsin nach Aminosäure 74, aber nach Aminosäure 87, so entsteht bei

der modifizierten Form von Troponin T das Nicht-Epitop-Fragment der Sequenz PNLVPPKIPDGERVDF (SEQ ID NO: 33) (1.792,9591 $[M+H]^+$), während bei der nicht modifizierten Form bei gleichzeitiger Spaltung nach Aminosäure 70 das Nicht-Epitop-Fragment der Sequenz MPNLVPPKIPDGERVDF (SEQ ID NO: 32) (1.923,9996 $[M+H]^+$) entsteht. Erfolgt weder eine Spaltung nach Aminosäure 74 noch nach Aminosäure 87, aber nach Aminosäure 91, so entsteht bei der modifizierten Form von Troponin T ein Nicht-Epitop-Fragment der Sequenz PNLVPPKIPDGERVDFDDIH RKRM (SEQ ID NO: 31) (2.844,4937 $[M+H]^+$). Bei der natürlichen Form entsteht bei gleichzeitiger Spaltung nach Aminosäure 70 ein Nicht-Epitop-Fragment der Sequenz MPNLVPPKIPDGERVDFDDI HRKRM (SEQ ID NO: 30) (2.975,5342 $[M+H]^+$).

2. Spalten von Troponin T mit Trypsin

Nicht modifizierte Form von Troponin T	Modifizierte Form von Troponin T	Aminosäuresequenz
7.831,2366		MSDIEEVVEEYEEEEQEEAA VEEQEEAAEEDAEAEAETEE TRAEEDEEEEEAKEAEDGPM EESKPKPR (SEQ ID NO: 39)
6.150,4589		MSDIEEVVEEYEEEEQEEAA VEEQEEAAEEDAEAEAETEE TRAEEDEEEEEAK (SEQ ID NO: 40)
4.861,9646		MSDIEEVVEEYEEEEQEEAA VEEQEEAAEEDAEAEAETEE TR (SEQ ID NO: 41)

Nicht modifizierte Form von Tr op on in T	Modifizierte Form von Tr op on in T	Aminosäuresequenz
4.098,8793		AEEDEEEEEAKEAEDGPMEE SKPKPRSFMPNLVPPK (SEQ ID NO: 42)
3.477,7140		EAEDGPMEESKPKPRSFMPN LVPPKIPDGER (SEQ ID NO: 43)
2.988,2898		AEEDEEEEEAKEAEDGPMEE SKPKPR (SEQ ID NO: 44)
2.810,3851		EAEDGPMEESKPKPRSFMPN LVPPK (SEQ ID NO: 45)
2.794,3980		SFMPNLVPPKIPDGERVDFD DIHR (SEQ ID NO: 46)
2.658,3449	2.658,3449	
2.582,3136	2.582,3136	
2.456,2350	2.456,2350	
2.438,2067	2.438,2067	
	2.429,2571	PNLVPPKIPDGERVDFDDIH R (SEQ ID NO: 47)
2.428,2289	2.428,2289	
2.383,1816	2.383,1816	
2.310,1118	2.310,1118	
2.300,1339	2.300,1339	
2.168,1458	2.168,1458	
2.079,0756	2.079,0756	
2.040,0508	2.040,0508	
1.992,0872	1.992,0872	

Nicht modifizierte Form von Tr op on in T	Modifizierte Form von Tr op on in T	Aminosäuresequenz
1.921,0501	1.921,0501	
1.911,9559	1.911,9559	
1.888,9988	1.888,9988	
1.852,9560	1.852,9560	
1.821,9381	1.821,9381	
1.820,0137	1.820,0137	
1.811,9034	1.811,9034	
1.796,9363		SFMPNLVPPKIPDGER (SEQ ID NO: 48)
1.792,9551	1.792,9551	
1.724,8611	1.724,8611	
1.699,7955		EAEDGPMEESKPKPR (SEQ ID NO: 49)
1.683,8085	1.683,8085	
1.663,9125	1.663,9125	
1.622,8060	1.622,8060	
1.596,7661	1.596,7661	
1.565,8798	1.565,8798	
1.560,8605	1.560,8605	
1.535,8176	1.535,8176	
1.438,7689	1.438,7689	
	1.431,7954	PNLVPPKIPDGER (SEQ ID NO: 50)
1.331,7416	1.331,7416	
1.315,7077	1.315,7077	
1.307,5121		AEEDEEEEEAK (SEQ ID NO: 51)

Nicht modifizierte Form von Tripton	Modifizierte Form von Tripton	Aminosäuresequenz
1.302,7124	1.302,7124	
1.300,6756	1.300,6756	
1.290,7164	1.290,7164	
1.242,6661	1.242,6661	
1.203,6467	1.203,6467	
1.188,5716	1.188,5716	
1.176,6484	1.176,6484	
1.144,5745	1.144,5745	
1.132,6069	1.132,6069	
1.129,6074		SFMPNLVPPK (SEQ ID NO: 52)
1.117,5344	1.117,5344	
1.089,5283	1.089,5283	
1.075,5517	1.075,5517	
1.054,5567	1.054,5567	
1.045,5636	1.045,5636	
1.016,4795	1.016,4795	
1.015,5279	1.015,5279	
1.001,5123	1.001,5123	
1.000,5646	1.000,5646	
974,5013	974,5013	
961,5173	961,5173	
961,4333	961,4333	
946,5064	946,5064	
946,4952	946,4952	

Nicht modifizierte Form von Trypton in T	Modifizierte Form von Trypton in T	Aminosäuresequenz
945,5628	945,5628	
918,5003	918,5003	
906,5043	906,5043	
885,5628	885,5628	
860,4584	860,4584	
857,5567	857,5567	
844,4635	844,4635	
818,4002	818,4002	
816,5050	816,5050	
805,3322	805,3322	
790,4053	790,4053	
779,3934	779,3934	
775,4784	775,4784	
	764,4665	PNLVPPK (SEQ ID NO: 53)
757,4679	757,4679	
746,4308	746,4308	
732,3635	732,3635	
731,3682	731,3682	
729,4617	729,4617	
691,3919	691,3919	
690,3053	690,3053	
689,3689	689,3689	
686,3467	686,3467	
678,3933	678,3933	

Nicht modifizierte Form von Tryptin	Modifizierte Form von Tryptin	Aminosäuresequenz
660,4151	660,4151	
631,3886	631,3886	
617,3253	617,3253	
601,3668	601,3668	
590,3620	590,3620	
575,3623	575,3623	
563,2970	563,2970	
533,2678	533,2678	
532,3453	532,3453	
475,2874	475,2874	
461,2830	461,2830	
447,2674	447,2674	
432,2565	432,2565	
419,2612	419,2612	
417,2204	417,2204	
407,1959	407,1959	
404,2503	404,2503	
403,3027	403,3027	
403,2663	403,2663	
403,2299	403,2299	
402,2572	402,2572	
333,2132	333,2132	
333,1921	333,1921	
303,2139	303,2139	

Nicht modifizierte Form von Troponin T	Modifizierte Form von Troponin T	Aminosäuresequenz
294,1812	294,1812	
291,1663	291,1663	
289,1619	289,1619	
276,1666	276,1666	
276,1554	276,1554	
275,2077	275,2077	
246,1560	246,1560	
218,1499	218,1499	
204,1342	204,1342	
175,1189	175,1189	
147,1128	147,1128	

Durch die trypsinspezifische Spaltung nach Aminosäure 78 entsteht bei der modifizierten Form von Troponin T ein Nicht-Epitop-Fragment mit der Sequenz PNLVPPK (SEQ ID NO: 53) und der Masse 764,4665 $[M+H]^+$. Dieses Fragment entsteht nur bei der modifizierten Form von Troponin T, das heißt bei Vorliegen des akuten Koronarsyndroms. Bei der nicht modifizierten Form von Troponin T entsteht durch die trypsinspezifische Spaltung an der gleichen Position und gleichzeitiger Spaltung nach Aminosäure 68, die in der modifizierten Form nicht vorhanden ist, ein Nicht-Epitop-Fragment der Sequenz SFMPNLVPPK (SEQ ID NO: 52) und der Masse 1.129,6074 $[M+H]^+$. Wird die Schnittschnelle bei Aminosäure 78 von der Protease ausgelassen, aber nach Aminosäure 84 geschnitten, entsteht nur bei

der modifizierten Form von Troponin T ein Nicht-Epitop-Fragment der Sequenz PNLVPPKIPDGER (SEQ ID NO: 50) (1.431,7954 $[M+H]^+$), bei der nicht modifizierten Form dagegen bei gleichzeitiger Spaltung nach Aminosäure 68 ein Nicht-Epitop-Fragment der Sequenz SFMPNLVPPKIPDGER (SEQ ID NO: 48) (1.796,9363 $[M+H]^+$). Wird nach den Aminosäuren 78 und 84 nicht geschnitten, aber nach Aminosäure 92, entsteht bei der modifizierten Form von Troponin T ein Nicht-Epitop-Fragment der Sequenz PNLVPPKIPDGERVDFDDIH R (SEQ ID NO: 47) (2.429,2571 $[M+H]^+$) und bei der nicht modifizierten Form bei gleichzeitiger Spaltung nach Aminosäure 68 ein Nicht-Epitop-Fragment der Sequenz SFMPNLVPPKIPDGERVDFD DIHR (SEQ ID NO: 46) (2.794,3980 $[M+H]^+$).

Patentansprüche

1. In-vitro Verfahren zur Diagnose von akutem Koronarsyndrom umfassend die Schritte:
a) Bereitstellen eines festen Trägers (1) mit mindestens einem Antikörper (2), an den mindestens ein kardiales Troponin-Protein (3) aus einer Probe (4) spezifisch gebunden ist;
b) Spalten des Troponin-Proteins (3) mit einem Enzym in mindestens ein an den Antikörper (2) gebundenes Epitop-Fragment (6) und mindestens ein Nicht-Epitop-Fragment (7);
c) Auslesen des durch das Enzym spezifisch gespaltenen Nicht-Epitop-Fragments (7), und
d) Diagnostizieren des akuten Koronarsyndroms anhand des Vorliegens und/oder Fehlens des enzymspezifischen Nicht-Epitop-Fragments (7).

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass Schritt b) bei einer Temperatur von etwa 40°C bis etwa 55°C, vorzugsweise von etwa 50°C bis etwa 53°C, und/oder für etwa 2 Minuten bis etwa 10 Minuten, vorzugsweise etwa 3 Minuten bis etwa 5 Minuten, durchgeführt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass nach Schritt b) das Epitop-Fragment (6) quantifiziert wird.

4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Troponin-Protein (3) Troponin I und/oder Troponin T ist.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Auslesen des durch das Enzym spezifisch gespaltenen Nicht-Epitop-Fragments (7) mittels Massenspektrometrie erfolgt.

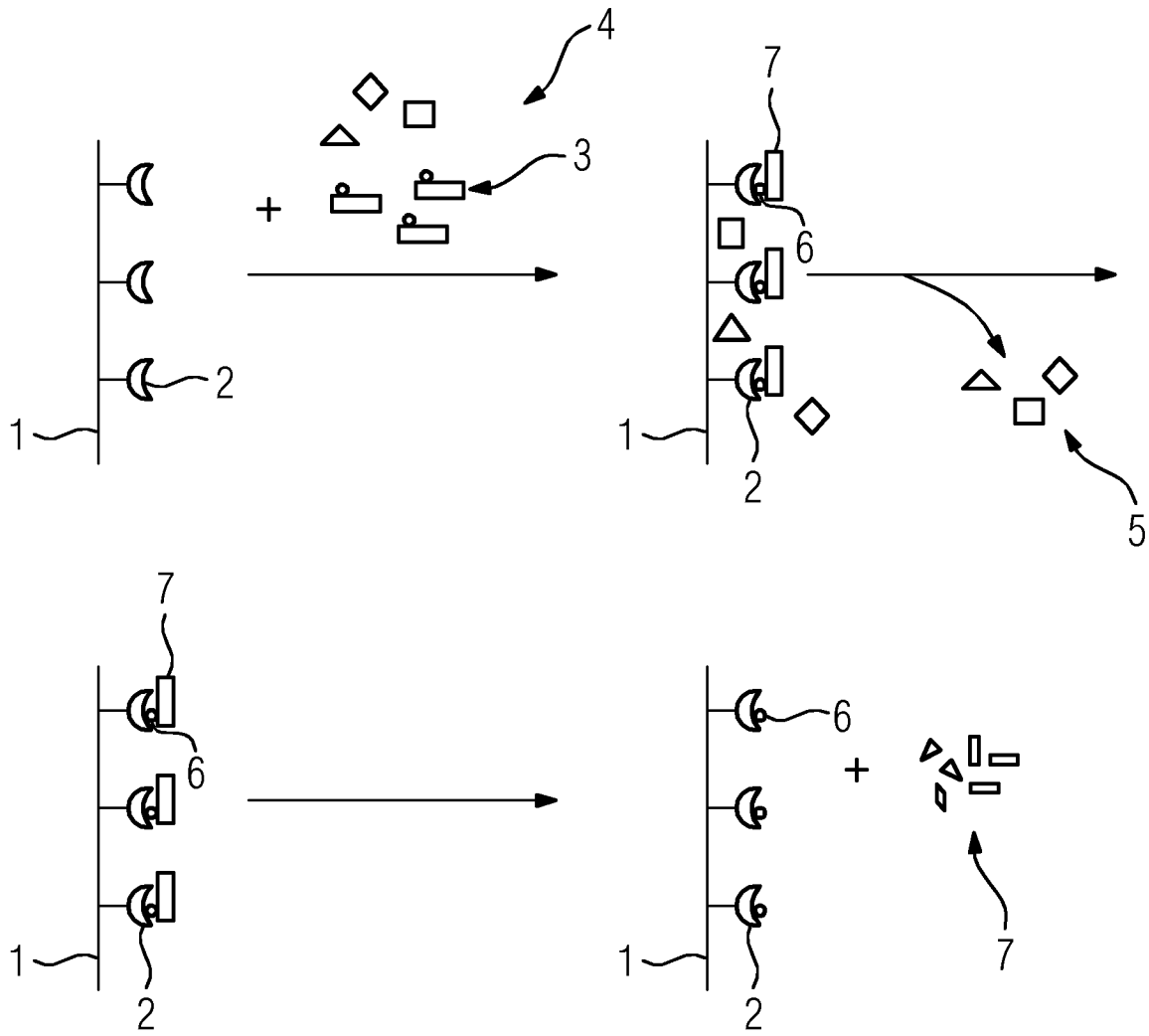
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass ein erster und ein zweiter Antikörper mit unterschiedlichen Spezifitäten verwendet werden.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass der erste Antikörper Troponin I und der zweite Antikörper Troponin T spezifisch bindet.

8. Kit zur Diagnose von akutem Koronarsyndrom umfassend einen festen Träger (1) mit mindestens einem ersten Antikörper und mindestens einem zweiten Antikörper, wobei die Antikörper jeweils unterschiedliche kardiale Troponin-Proteine spezifisch binden.

9. Verwendung von mindestens einem durch ein Enzym spezifisch gespaltenen Nicht-Epitop-Fragment (7) mindestens eines kardialen Troponin-Proteins (3) zur Diagnose von akutem Koronarsyndrom.

10. Verwendung von mindestens einem durch ein Enzym spezifisch gespaltenen Nicht-Epitop-Fragment (7) mindestens eines kardialen Troponin-Proteins (3) zum Nachweis von mindestens einer posttranslationalen Modifikation des Troponin-Proteins (3).


4
3
2
1
7
6
5
7
6
1
2
6
7
1
2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2013/076824

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N33/50 G01N33/53 G01N33/543
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MARCUS MACHT ET AL: "Mass Spectrometric Mapping of Protein Epitope Structures of Myocardial Infarct Markers Myoglobin and Troponin T +", BIOCHEMISTRY, vol. 35, no. 49, 15 November 1996 (1996-11-15), pages 15633-15639, XP055109874, ISSN: 0006-2960, DOI: 10.1021/bi961727w page 15633 - page 15638	1-7,9,10
X	US 2005/164317 A1 (BUECHLER KENNETH F [US] ET AL) 28 July 2005 (2005-07-28) abstract; examples	8

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
3 April 2014	17/04/2014

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Gonçalves Mauger, M

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2011/129818 A1 (ADAMCZYK MACIEJ [US] ET AL) 2 June 2011 (2011-06-02) paragraph 165 - page 17, paragraph 167; example 2	8
X	WO 2010/042126 A1 (NANOSPHERE INC [US]; GIBBONS WINTON G [US]; HOLZMAN THOMAS F [US]; LEF) 15 April 2010 (2010-04-15)	8
A	abstract; claims; examples	1-7,9,10
X	WO 02/23191 A1 (UNIV SYDNEY [AU]; CHRISTOPHERSON RICHARD IAN [AU]; DOS REMEDIOS CRISTO) 21 March 2002 (2002-03-21)	8
A	abstract; claims	1-7,9,10
X	WO 2010/073182 A1 (KONINKL PHILIPS ELECTRONICS NV [NL]; DITTMER WENDY U [NL]; EVERS TOON) 1 July 2010 (2010-07-01)	8
A	abstract; claims	1-7,9,10
X	WO 02/089657 A2 (BIOSITE INC [US]; VALKIRS GUNARS E [US]; DAHLEN JEFFREY R [US]; KIRCHI) 14 November 2002 (2002-11-14)	8
A	abstract; claims	1-7,9,10
A	MARTIN MÖCKEL ET AL: "The acute coronary syndrome diagnosis and prognostic evaluation by troponin I is influenced by the test system affinity to different troponin complexes", CLINICA CHIMICA ACTA, vol. 293, no. 1-2, 1 March 2000 (2000-03-01), pages 139-155, XP055109723, ISSN: 0009-8981, DOI: 10.1016/S0009-8981(99)00244-2 abstract	1-10

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2013/076824

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2005164317 A1	28-07-2005	US 6991907 B1	31-01-2006
		US 2005164317 A1	28-07-2005
		US 2010167307 A1	01-07-2010
		US 2011143455 A1	16-06-2011
		US 2012129198 A1	24-05-2012
US 2011129818 A1	02-06-2011	US 2011129818 A1	02-06-2011
		WO 2011068681 A1	09-06-2011
WO 2010042126 A1	15-04-2010	EP 2348968 A1	03-08-2011
		WO 2010042126 A1	15-04-2010
WO 0223191 A1	21-03-2002	AU 8560501 A	26-03-2002
		BR 0117128 A	08-09-2004
		CA 2460001 A1	21-03-2002
		CN 1559005 A	29-12-2004
		EP 1436615 A1	14-07-2004
		JP 2004531687 A	14-10-2004
		KR 20040062539 A	07-07-2004
		NZ 531748 A	28-07-2006
		US 2005095591 A1	05-05-2005
		WO 0223191 A1	21-03-2002
WO 2010073182 A1	01-07-2010	CN 102257391 A	23-11-2011
		EP 2380026 A1	26-10-2011
		JP 2012513586 A	14-06-2012
		RU 2011130535 A	27-01-2013
		US 2011256640 A1	20-10-2011
		WO 2010073182 A1	01-07-2010
WO 02089657 A2	14-11-2002	AT 439588 T	15-08-2009
		AT 458199 T	15-03-2010
		AU 2002305394 A1	18-11-2002
		CA 2414073 A1	14-11-2002
		EP 1322957 A2	02-07-2003
		EP 1666881 A2	07-06-2006
		EP 2261669 A1	15-12-2010
		JP 3806694 B2	09-08-2006
		JP 4235652 B2	11-03-2009
		JP 2004520598 A	08-07-2004
		JP 2005121664 A	12-05-2005
		JP 2006234823 A	07-09-2006
		US 2003109420 A1	12-06-2003
		US 2006063204 A1	23-03-2006
		WO 02089657 A2	14-11-2002

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2013/076824

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. G01N33/50 G01N33/53 G01N33/543
ADD.

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
G01N

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	MARCUS MACHT ET AL: "Mass Spectrometric Mapping of Protein Epitope Structures of Myocardial Infarct Markers Myoglobin and Troponin T +", BIOCHEMISTRY, Bd. 35, Nr. 49, 15. November 1996 (1996-11-15), Seiten 15633-15639, XP055109874, ISSN: 0006-2960, DOI: 10.1021/bi961727w Seite 15633 - Seite 15638	1-7,9,10
X	US 2005/164317 A1 (BUECHLER KENNETH F [US] ET AL) 28. Juli 2005 (2005-07-28) Zusammenfassung; Beispiele	8

-/--

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen [X] Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
3. April 2014	17/04/2014

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Gonçalves Mauger, M

1

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 2011/129818 A1 (ADAMCZYK MACIEJ [US] ET AL) 2. Juni 2011 (2011-06-02) Absatz 165 - Seite 17, Absatz 167; Beispiel 2	8

X	WO 2010/042126 A1 (NANOSPHERE INC [US]; GIBBONS WINTON G [US]; HOLZMAN THOMAS F [US]; LEF) 15. April 2010 (2010-04-15)	8
A	Zusammenfassung; Ansprüche; Beispiele	1-7,9,10

X	WO 02/23191 A1 (UNIV SYDNEY [AU]; CHRISTOPHERSON RICHARD IAN [AU]; DOS REMEDIOS CRISTO) 21. März 2002 (2002-03-21)	8
A	Zusammenfassung; Ansprüche	1-7,9,10

X	WO 2010/073182 A1 (KONINKL PHILIPS ELECTRONICS NV [NL]; DITTMER WENDY U [NL]; EVERS TOON) 1. Juli 2010 (2010-07-01)	8
A	Zusammenfassung; Ansprüche	1-7,9,10

X	WO 02/089657 A2 (BIOSITE INC [US]; VALKIRS GUNARS E [US]; DAHLEN JEFFREY R [US]; KIRCHI) 14. November 2002 (2002-11-14)	8
A	Zusammenfassung; Ansprüche	1-7,9,10

A	MARTIN MÖCKEL ET AL: "The acute coronary syndrome diagnosis and prognostic evaluation by troponin I is influenced by the test system affinity to different troponin complexes", CLINICA CHIMICA ACTA, Bd. 293, Nr. 1-2, 1. März 2000 (2000-03-01), Seiten 139-155, XP055109723, ISSN: 0009-8981, DOI: 10.1016/S0009-8981(99)00244-2 Zusammenfassung	1-10

1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2013/076824

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 2005164317 A1	28-07-2005	US 6991907 B1	31-01-2006
		US 2005164317 A1	28-07-2005
		US 2010167307 A1	01-07-2010
		US 2011143455 A1	16-06-2011
		US 2012129198 A1	24-05-2012
US 2011129818 A1	02-06-2011	US 2011129818 A1	02-06-2011
		WO 2011068681 A1	09-06-2011
WO 2010042126 A1	15-04-2010	EP 2348968 A1	03-08-2011
		WO 2010042126 A1	15-04-2010
WO 0223191 A1	21-03-2002	AU 8560501 A	26-03-2002
		BR 0117128 A	08-09-2004
		CA 2460001 A1	21-03-2002
		CN 1559005 A	29-12-2004
		EP 1436615 A1	14-07-2004
		JP 2004531687 A	14-10-2004
		KR 20040062539 A	07-07-2004
		NZ 531748 A	28-07-2006
		US 2005095591 A1	05-05-2005
		WO 0223191 A1	21-03-2002
WO 2010073182 A1	01-07-2010	CN 102257391 A	23-11-2011
		EP 2380026 A1	26-10-2011
		JP 2012513586 A	14-06-2012
		RU 2011130535 A	27-01-2013
		US 2011256640 A1	20-10-2011
		WO 2010073182 A1	01-07-2010
WO 02089657 A2	14-11-2002	AT 439588 T	15-08-2009
		AT 458199 T	15-03-2010
		AU 2002305394 A1	18-11-2002
		CA 2414073 A1	14-11-2002
		EP 1322957 A2	02-07-2003
		EP 1666881 A2	07-06-2006
		EP 2261669 A1	15-12-2010
		JP 3806694 B2	09-08-2006
		JP 4235652 B2	11-03-2009
		JP 2004520598 A	08-07-2004
		JP 2005121664 A	12-05-2005
		JP 2006234823 A	07-09-2006
		US 2003109420 A1	12-06-2003
		US 2006063204 A1	23-03-2006
		WO 02089657 A2	14-11-2002